

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012399857

WPI Acc No: 1999-205964/199918

New polypeptides comprising prion protein sequences - useful for diagnosis or treatment of prion diseases e.g. Scrapie, BSE and Creutzfeldt-Jacob disease

Patent Assignee: PRIONICS AG (PRIO-N)

Inventor: KORTH C; MOSER M; OESCH B

Number of Countries: 071 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19741607	A1	19990325	DE 1041607	A	19970920	199918 B
WO 9915651	A1	19990401	WO 98EP5924	A	19980917	199920
AU 9897448	A	19990412	AU 9897448	A	19980917	199934
EP 1012287	A1	20000628	EP 98951427	A	19980917	200035
			WO 98EP5924	A	19980917	

Priority Applications (No Type Date): DE 1041607 A 19970920

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

DE 19741607 A1 11 C07K-007/08

WO 9915651 A1 G C12N-015/12

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BA BG BR CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GE GH GM HR HU ID IL IS JP KE KP KR LK LR LS LT LU LV MK MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TR UA UG US VN YU ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG ZW

AU 9897448 A C12N-015/12 Based on patent WO 9915651

EP 1012287 A1 G C12N-015/12 Based on patent WO 9915651

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

Abstract (Basic): DE 19741607 A

NOVELTY - A synthetic polypeptide comprising at least one 'defined' PrP sequences or sequences derived therefrom that are recognised by PrP(Sc)-binding substances [PrP = prion protein; PrP(Sc) = disease-specific isoform of PrP]. DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) a pharmaceutical composition for therapy of prion diseases, comprising at least one synthetic polypeptide as above or at least one PrP(Sc)-binding substance that recognises the 'defined' sequences; (2) an agent for diagnosis of prion diseases, comprising at least one synthetic polypeptide as above or at least one PrP(Sc)-binding substance that recognises the 'defined' sequences; (3) a vaccine for prevention and therapy of prion diseases, comprising at least one synthetic polypeptide as above or at least one PrP(Sc)-binding substance that recognises the 'defined' sequences; (4) a DNA molecule coding at least for a synthetic polypeptide as above; (5) a process for producing PrP(Sc)-specific antibodies, comprising immunising nonhuman mammals with at least one polypeptide as above and isolating the resulting antibodies; (6) a method for detecting PrP(Sc)-specific surface sequence regions, comprising incubating a PrP-specific peptide library with PrP(Sc)-binding substances and visualising the binding regions of the peptide library; and (7) use of polypeptides as above in a pharmaceutical or chemical library for the detection of PrP(Sc)-specific agents.

USE - The new prion protein polypeptides are useful in vaccines and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY

pharmaceuticals for treatment of, and as diagnostic agents for diagnosis of Scrapie, BSE, Kuru and Creutzfeldt-Jacob disease. The polypeptides are also useful in pharmaceutical or chemical libraries for detection of PrP(Sc)-specific agents.

Dwg.0/4

Derwent Class: B04; C03; C07; D16; S03

International Patent Class (Main): C07K-007/08; C12N-015/12

International Patent Class (Additional): A61K-038/08; A61K-038/10;
A61K-038/16; A61K-038/17; A61K-039/395; C07H-021/04; C07K-007/06;
C07K-014/00; C07K-014/47; C07K-016/18; C12N-015/11; G01N-033/53;
G01N-033/577; G01N-033/68

?

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 41 607 A 1**

⑺ Aktenzeichen: 197 41 607.1
⑻ Anmeldetag: 20. 9. 97
⑿ Offenlegungstag: 25. 3. 99

⑥ Int. Cl.⁶:
C 07 K 7/08
C 07 K 7/06
C 07 K 14/00
C 07 K 16/18
A 61 K 38/10
A 61 K 38/08
A 61 K 38/16
C 07 H 21/04
C 12 N 15/11
G 01 N 33/577
G 01 N 33/53

DE 197 41 607 A 1

⑦ Anmelder:
PRIONICS AG, Zürich, CH

⑧ Vertreter:
Patentanwälte Schaefer & Emmel, 22043 Hamburg

⑫ Erfinder:
Moser, Markus, Zürich, CH; Oesch, Bruno, Stilli, CH;
Korth, Carsten, San Francisco, Calif., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen

⑤7 Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrPSc-bindenden Substanzen erkannt werden.

DE 197 41 607 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf synthetische Polypeptide, die insbesondere bei der Diagnose, Vorbeugen und Behandlung von einer Reihe von übertragbaren, degenerativen neurologischen Erkrankungen Verwendung finden können. Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff spongiforme Enzephalopatie oder auch Prionerkrankungen zusammengefaßt. Sie treten in unterschiedlichen Säugetierspezies auf, z. B. als Scrapie bei Schafen, als BSE bei Kühen und als Kuru oder Creutzfeldt-Jacob-Krankheit bei Menschen.

Als einziges mit dem infektiösen Agens assoziiertes Molekül wurde bislang ein krankheitsspezifisches Prionprotein (PrP^{Sc}) gefunden, das eine abnorme Isoform eines normalen Wirtsproteins (PrP^{C}) unbekannter Funktion ist. Beide Isoformen PrP^{Sc} und PrP^{C} stimmen bezüglich Molekulargewicht und Aminosäuresequenz überein. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Faltung und ihren Eigenschaften. Während z. B. PrP^{C} überwiegend α -helicale Sekundärstrukturen besitzt, löslich und proteaseverdaulich ist, weist PrP^{Sc} vor allem β -Faltblattstrukturen auf, ist unlöslich und kann von Proteasen nur teilweise abgebaut werden. Viele Indizien, insbesondere die Abwesenheit von anderen Molekülen außer PrP^{Sc} im Prion, und vor allem die Abwesenheit von Nukleinsäuren, deuten darauf hin, daß PrP^{Sc} eine (wenn nicht die) zentrale Rolle bei der Auslösung der oben genannten Krankheiten zukommt. Es wird angenommen, daß PrP^{Sc} -Proteine in der Lage sind, normale PrP^{C} -Proteine in die krankheitsspezifische Faltung zu konvertieren, was die Infektiosität von PrP^{Sc} -Proteinen erklären würde.

Es scheint daher vielversprechend ausgehend von PrP^{Sc} als zentralen Krankheitsmolekül Therapie- oder Diagnosemöglichkeiten zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist in diesem Zusammenhang, synthetische Polypeptide bereitzustellen, die immunogene Eigenschaften oder generell Bindungseigenschaften des PrP^{Sc} nicht jedoch dessen Infektiosität aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe mit synthetischen Polypeptiden entsprechend des Anspruchs 1.

Es handelt sich dabei um Polypeptide, die eine oder mehrere definierte Sequenzen des PrP (PrP bezeichnet das Prionprotein im allgemeinen unabhängig von seiner Konfiguration) enthalten, wobei diese Sequenzen von PrP^{Sc} -bindenden Substanzen in z. B. den weiter unten beschriebenen Mapping-Experimenten erkannt werden. Es gibt eine ganze Reihe von unterschiedlichen PrP^{Sc} -spezifisch bindenden Substanzen. Beispiele hierfür sind weiter unten angegeben.

Zusammengefaßt enthalten die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide dann mindestens eine Sequenz, die im nativen PrP^{Sc} an dessen Oberfläche angeordnet ist und dort alleine oder in Verbindung mit weiteren der im Rahmen der Erfindung einsetzbaren Sequenzen eine Bindungsstelle bilden. An der Ausbildung dieser PrP^{Sc} -spezifischen Oberflächenstrukturen ist mindestens eine der beiden im Strukturmodell des rekombinanten PrP vorhandenen β -Faltblattstrukturen, oder beide, beteiligt. Es wird angenommen, daß diese Strukturen im PrP^{Sc} als Nukleationspunkt bei der Ausbildung der Oberfläche einen dominierenden Einfluß haben.

Künstliche Polypeptide, die im nativen PrP^{Sc} vorhandene Bindungsstelle simulieren, können sowohl zur Therapie oder Diagnose als auch zur Vorbeugung und sonstigen Anwendungszwecken von Interesse sein.

Unter die Erfindung fallen insbesondere synthetische Polypeptide, die einen oder mehrere der im Anspruch 2 genannten folgenden Sequenzbereiche aufweisen:

- a) Gly-R₁-Asp-R₂-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)
- c) Cys-R₇-Thr-Gln-Tyr-R₈-R₉-Glu-Ser-R₁₀-Ala-(R₁₁Tyr)
- d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R₁₂-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R₁ = Asn oder Ser, R₂ = Trp oder Tyr, R₃ = Arg oder Lys, R₄ = Met, Val oder Ala, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn, R₇ = Val, Thr oder Ile, R₈ = Gln oder Glu, R₉ = Lys, Arg oder Gln, R₁₀ = Gln oder Glu, R₁₁ und Tyr, Ser oder Ala und R₁₂ = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

Weitere synthetische Polypeptide im Rahmen der Erfindung können nach Anspruch 3 eine oder mehrere der folgenden Sequenzen enthalten:

- e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- f) Lys-Pro-R₁₄-Lys-Pro-Lys-Thr-R₁₄-R₁₅-Lys-His-R₁₆-Ala-Gly
- g) Tyr-R₁₆-Leu-Gly-Ser
- h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R₁₇-R₁₇-His-Phe-Gly-R₁₄-Asp
- i) Asn-Met-R₁₈-Arg-Tyr-(Pro-R₁₄)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R₁₉)

in denen R₁₄ = Asn oder Ser, R₁₅ = Met, Leu oder Phe, R₁₆ = Met oder Val, R₁₇ = Ile, Leu oder Met, R₁₈ = His, Tyr oder Asn und R₁₉ = Lys oder Arg ist und die in Klammern gesetzten Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

Die Sequenzen gemäß Anspruch 2 und 3 wurden in sogenannten "Mapping-Experimenten" auf einer immobilisierten Peptidbank gefunden. Auf der benutzten Peptidbank (erhältlich von Jerini Biotools, Berlin) sind 104 Peptide mit jeweils 13 Aminosäuren mit ihrem C-terminalen Ende auf einer Cellulosemembran befestigt. Sie decken die gesamte Sequenz des PrP (PrP bezeichnet im folgenden generell die dem Prionprotein zugrundeliegende Aminosäuresequenz unabhängig von der Konformation) ab und sind so angeordnet, daß sie um jeweils zwei Aminosäuren verschoben sind, d. h. jeweils 11 Aminosäuren zwischen zwei benachbarten Peptiden überlappen. In mehreren Mapping-Experimenten wurden Peptidbanken mit unterschiedlichen PrP^{Sc} bindenden Substanzen beaufschlagt und die Bindung dieser Substanzen an spezielle Sequenzbereiche unter Verwendung z. B. eines Chemolumineszenz-Kits (ECL, Amersham, USA) sichtbar gemacht.

Zur Ermittlung der Sequenzen gemäß Anspruch 2 wurden in "Mapping-Experimenten" als PrP^{Sc} -bindende Substanzen ein PrP^{Sc} -spezifischen Antikörper mit der Bezeichnung 15B3 und (wie in eigenen Vorversuchen gezeigt wurde ebenfalls

PrP^{Sc}-spezifisches) rekombinantes bovines-PrP (rbPrP) mit der in Fig. 4 angegebenen Sequenz eingesetzt. Zur Herstellung von rbPrP kann z. B. eine Zelllinie (z. B. E. coli) mit einem Vektor, der rbPrP exprimiert, in einem geeigneten Medium (z. B. Luria-Broth) angezogen und dann aus den Inklusionskörpern der Zellen nach Lysis und weiteren konventionellen Reinigungsmethoden das Prion-Protein isoliert werden (siehe auch Hornemann et al., FEBS-Letters (97) 413 (2; 277-28)).

Bei 15B3 handelt es sich um einen unlängst von den Erfindern entdeckten monoklonalen PrP^{Sc}-Antikörper. Hybridomazellen, die die genannten (PrP^{Sc}-spezifischen) Antikörper 15B3 produzieren, wurden am 13. Februar 1997 unter der Nummer DSM ACC2298 bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig hinterlegt.

In beiden Fällen erkannten die beiden unterschiedlichen bindenden Substanzen, der Antikörper 15B3 und das rekombinante rbPrP übereinstimmend die Sequenzen a-d gemäß Anspruch 1, wie für 15B3 in Fig. 1 und für rbPrP in Fig. 2 wiedergegeben.

Die in Fig. 1 und 2 angegebenen Nummern bezeichnen die unterschiedlichen Peptidsequenzen der Bank, an denen der monoklonale Antikörper 15B3 bzw. rbPrP bindet. Die erfindungsgemäßen Sequenzen entsprechend dabei jeweils den den jeweiligen räumlich benachbarten Bindungspeptiden gemeinsamen Bereichen. Fig. 2 gibt dabei wie bereits erwähnt das Ergebnis eines Mappingexperimentes wieder, dessen Bedingungen dem in Fig. 1 dargestellten Experiment entsprechen. Hier wurde lediglich der Antikörper 15B3 gegen rekombinantes bovines rbPrP ausgetauscht. Die Bindungsstellen des rekombinanten rbPrP sind auf der aus technischen Gründen nicht besser wiederzugebende Darstellung mit Markierungen hervorgehoben. Es handelt sich um mit Fig. 1 übereinstimmende Bindungsstellen.

Die in Anspruch 3 angegebenen Sequenzen wurden ebenfalls mittels Mappingexperimenten ermittelt. Allerdings wurde hier als erkennende Substanz nicht ein Antikörper oder rbPrP, sondern der Farbstoff Kongorot eingesetzt, dessen spezifische Bindung für PrP^{Sc} bereits seit längerem bekannt ist (Prusiner et al., Cell 35, 349-358; 1983). Fig. 3 zeigt die entsprechende Peptidbank mit den angefärbten Bindungsbereichen, aus denen wie oben angegeben die Sequenzen e-i ermittelt wurden.

In den Fig. 1-3 erkennt man, daß es sich bei den Sequenzen a-d bzw. e-i um nicht linear zusammenhängende Sequenzen aus PrP handelt. An einem 3-dimensionalen Modell eines C-terminalen Fragments von rekombinantem Maus-PrP konnte gezeigt werden, daß sich hier zwei der im Anspruch 2 angegebenen Sequenzen a-d in räumlicher Nähe zueinander befinden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist davon auszugehen, daß bei der Konformationsänderung auch die beiden anderen Sequenzen eine andere Position einnehmen, dergestalt daß im PrP^{Sc} wohl alle vier Sequenzen a-d benachbart angeordnet sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein konformationelles Epitop ausbilden.

Die beanspruchten Sequenzen stellen damit Sequenzbereiche dar, die in einer Peptidbank einzeln von z. B. einem PrP^{Sc}-spezifischen Antikörper erkannt werden und die darüber hinaus mit hoher Wahrscheinlichkeit im nativen PrP^{Sc}-Protein einzeln oder zu mehreren einen oberflächlichen Bindungsbereich z. B. ein Epitop ausbilden. Unter Epitop wird der spezifische Ort auf der Oberfläche des PrP^{Sc}-Proteins verstanden, der z. B. durch das Idiotyp von 15B3 gebunden werden kann.

Erfindungsgemäß werden damit synthetische Polypeptide bereitgestellt, die im Mindestfall eine der von den genannten PrP^{Sc}-bindenden Substanzen in der Peptidbank erkannten Sequenzen (sowie möglicherweise zusätzliche) enthalten.

Künstliche Polypeptide, die einen antigenen Bereich von PrP^{Sc} aufweisen, sind bereits in der WO 93/11153 angegeben worden. Die dort genannten Sequenzen stellen relativ umfangreich Ausschnitte aus der PrP-Sequenz dar. Die genaue Abgrenzung einer Sequenz, die z. B. ein Epitop ausbildet oder daran beteiligt ist, fehlt, was insbesondere den räumlichen Nachbau von minimalen synthetischen Polypeptiden mit z. B. der immunogenen Wirkung von PrP^{Sc} erschwert bzw. unmöglich macht.

Wie oben ausgeführt, können die synthetischen Polypeptide im Minimalfall lediglich aus einer der z. B. im Anspruch 2 oder genannten Sequenzen bestehen. Es ist aber auch möglich, sie mit geeigneten weiteren Sequenzen, die im Folgenden Konformationssequenzen genannt werden, zu verbinden.

Theoretisch wäre es z. B. möglich, die z. B. die Sequenzen ggf. über diese Konformationssequenzen und eventuelle weitere Sequenzen dergestalt untereinander zu verbinden, daß die vermutete räumliche Anordnung im PrP^{Sc}-Protein simuliert wird. Im Idealfall würde man auf diese Weise ein Protein mit einer Oberfläche (Epitop) erhalten, in dem wie im PrP^{Sc} mehrere räumlich benachbarte Bindungsstellen enthalten sind.

Erfindungsgemäß ist in einer Ausgestaltung zunächst jedoch vorgesehen, lediglich eine der beanspruchten Sequenz (Sequenz b) dergestalt mit einer Konformationssequenz zu verknüpfen, daß ein synthetisches Polypeptid mit ausreichender immunogener Bindungswirkung z. B. für 15B3 entsteht, wie Untersuchungen der Erfinder zeigten. Ein Polypeptid in dieser Ausgestaltung kann eine der beiden folgenden Sequenzen aufweisen:

- j) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-Z-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-(Y)
 k) (X)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z. B. Gly-Gly ist, R₃ = Arg oder Lys, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn und R₁₃ = Met oder Val ist und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

Die Sequenz j enthält in ihrem C-terminalen Bereich die Sequenz b, die über z. B. den Spacer Gly-Gly mit der sich N-terminal anschließenden Konformationssequenz verbunden ist. In der Sequenz k ist die Abfolge genau umgekehrt. Weitere geeignete Spacer sind generell alle solche Sequenzen, die ausreichende Flexibilität zwischen den verbundenen Peptidbereichen gewährleisten und keinen Einfluß auf die Konformation haben.

Beide bevorzugt eingesetzten synthetischen Polypeptide wurden ausgehend von der Feststellung konzipiert, daß in PrP^{Sc} verstärkt β -Faltblatt-Strukturen auftreten, wobei in aller Regel sequenzauf- oder abwärts eine Konformationssequenz vorliegt, die eine β -Faltblatt-Struktur induziert. Die synthetischen Polypeptide gemäß Anspruch 6 wurden daher mit geeigneten Konformationssequenzen ausgestattet, um die Epitopsequenz in einer für PrP^{Sc}-spezifischen β -Faltblatt-

Struktur anzuordnen.

Wie allgemein bekannt, können Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Größe und ihrer Polarität bzw. Ladung unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Man nennt die in eine Gruppe fallenden Aminosäuren untereinander homolog und unterscheidet folgende 5 Gruppen:

- 1.) Kleine aliphatische nicht polare oder nur geringfügig polare Säuren: Alanin, Serin, Threonin und in Grenzen Glycin, Prolin
- 2.) Polare, negativ geladene Säuren und ihre Amide Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure und Glutamin
- 3.) Polare, positiv geladene Säuren: Histidin, Arginin, Lysin
- 4.) Große aliphatische, nicht polare Säuren: Methionin, Leucin, Isoleucin, Valin, Cystein
- 6.) Große aromatische Säuren: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

In vielen Fällen können in Peptidsequenzen enthaltene Aminosäuren durch entsprechende Säuren aus derselben Gruppe ersetzt werden, ohne daß die Eigenschaften der Sequenz dadurch eine Änderung erfahren. Unter die Erfindung fallen daher auch solche Sequenzen, die nicht den explizit genannten Formeln entsprechen, sondern in denen ein Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren gegen eine homologe Säure vorgenommen wurde.

Weiterhin kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß Aminosäuresequenzen unabhängig von ihrer Bildungseinrichtung unter bestimmten Umständen ähnliche Bindungseigenschaften, insbesondere Antikörperbindungseigenschaften haben können. Man spricht in diesem Fall von retro-Aminosäuresequenzen und bezeichnet damit übereinstimmende Sequenzen, die in C- oder N-terminaler Richtung gebildet sind (z. B. [N-terminal]-Glu-Ala-Val-Leu-[C-terminal], [N-terminal]-Leu-Val-Ala-Glu-[C-terminal]). Falls die verwendeten Aminosäuren statt der in Tieren vorkommenden L-Form in der chiralen D-Gegenform vorliegen, so werden die Epitopbereiche spiegelbildlich ausgebildet und ebenfalls von einigen Antikörpern erkannt, wobei sich die Isotypen der Antikörper in diesen Eigenschaften unterscheiden. Man spricht in diesem Fall von inverso-Aminosäuresequenzen. Falls sowohl inverso als auch retro-Aminosäuren verwendet werden, ergeben sich z. B. übereinstimmende Epitopbereiche, die uneingeschränkt von dem zur ursprünglichen Sequenz spezifischen Antikörper gebunden werden. Der Vorteil der Verwendung von z. B. retro-inverso-Aminosäuresequenzen besteht darin, daß D-Aminosäuren vom Organismus langsamer abgebaut werden, da sie von den abbauenden Enzymen schlechter erkannt werden. Der gleiche Effekt kann auch durch die Substitution von nicht natürlichen Aminosäuren erzielt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide können daher auch in retro- und/oder inverso Form vorliegen oder weiterhin auch nicht natürliche (also nicht von Organismus produzierte) Aminosäuren enthalten. Nichtnatürliche Aminosäuren lassen sich durch Synthetisierung von z.B. zusätzlichen Seitenketten oder reaktiven Gruppen gezielt mit speziellen Eigenschaften und an bestimmte Anwendungszwecke angepaßt herstellen.

Wie oben ausgeführt, können die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide insbesondere bei der Behandlung, Vorbeugung oder auch Diagnose von Prionerkrankungen eingesetzt werden.

Es ist insbesondere daran gedacht, die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide als Impfstoff darzustellen. Dazu wird z. B. eine ausreichende Menge Peptid mit Freund's komplettem Adjuvans aufgelöst und subkutan oder intramuskulär injiziert. In mehrwöchigen Abständen wird wiederum eine immunogene Menge Peptid in Freund's inkomplettem Adjuvans aufgelöst und injiziert (Boost). Ziel der Impfung ist, eine Immunantwort zu provozieren, die die endogene Produktion von Antikörpern beinhaltet, die spezifisch PrP^{Sc} erkennen und neutralisieren bzw. kennzeichnen können, so daß körpereigene Abwehrmechanismen einer Erkrankung vorbeugen bzw. den Krankheitsprozeß verlangsamen bzw. stoppen können.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die synthetischen Polypeptide in der Diagnose und Therapie einzusetzen. Nach der herrschenden Konversionstheorie wird davon ausgegangen, daß PrP^{Sc} und/oder PrP^C auch untereinander binden. Gestützt wird diese Annahme durch weitere Mappingversuche der Erfinder, in denen gezeigt wurde, daß (wie aus Fig. 2 zu entnehmen) rekombinantes bovines rbPrP an ähnlichen Sequenzbereichen bindet wie der oben genannte Antikörper 15B3.

Die erwähnten Bindungseigenschaften kann man sich z. B. bei der Therapie zunutze machen. Denkbar wäre, die erfindungsgemäßen Polypeptide in den Körper eines erkrankten Patienten hirngängig zu applizieren und dort dem infektiösen PrP^{Sc} als Bindungspartner zur Verfügung zu stellen. Auf diese Weise könnte man die Konversionsrate möglicherweise drastisch senken und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen. Zu Diagnosezwecken wäre es denkbar, in Probematerial eventuell erhaltenes PrP^{Sc} mittels der erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch zu binden und dann auf geeignete Weise nachzuweisen.

Die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide sind nicht auf die angegebenen Sequenzen beschränkt. Denkbar sind auch Peptide, die in derivatisierter Form vorliegen. Interessant könnte es z. B. sein, solche Peptide mit einem Carrier bzw. Immunogen, wie z. B. Diphteriatoxid oder BSA zur Verstärkung der Immunantwort zu verbinden. Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung wäre die Verknüpfung mit Markern, wie z. B. Biotin oder Peroxidase bzw. mit Enzymen oder Nukleinsäuren. Denkbar wäre schließlich auch, Signalsequenzen vorzusehen, die die Durchgängigkeit der Peptide in gewünschte Kompartimente erleichtern. Gedacht ist dabei insbesondere an die Blut-Hirn-Schranke, deren Passage durch Verwendung von Signalsequenzen, die z. B. an Transferrinrezeptor binden, erleichtert werden können.

Wie oben mehrfach angesprochen, sollen die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide bei der Therapie, Diagnose und Prophylaxe von Prionerkrankungen Verwendung finden. In Verbindung mit allen genannten Anwendungszwecken ist ein wesentliches Element, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide einzeln oder in Verbindung mit weiteren Substanzen einem Patienten verabreicht werden, wobei, wie oben ausgeführt, derivatisierte Formen eingesetzt werden können, um die Gängigkeit in bestimmte Kompartimente zu erhöhen.

Die Herstellung der Polypeptide kann auf beliebige Weise erfolgen. Entweder direkt über übliche Peptidsynthesetechniken oder aber auch indirekt über RNA- oder DNA-Synthese und dann mittels konventioneller molekularbiologischer Techniken. Dementsprechend richtet sich ein weiterer Aspekt der Erfindung auf ein DNA-Molekül, das in der Lage ist, eins der erfindungsgemäßen Polypeptide zu kodieren. Vorzugsweise wird ein solches DNA-Molekül (ggf. auch in ei-

ner längeren Sequenz) in einem geeigneten Expressionsvektor zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Routinetechniken.

Die Erfindung richtet sich weiterhin auch auf einen Kit zur Diagnose von PrP^{Sc} bzw. von Antikörpern gegen PrP^{Sc}, der mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide enthält. Man macht sich hierbei die Tatsache zunutze, daß die Polypeptide spezifisch am PrP^{Sc} und an den dagegen gerichteten Antikörpern zu binden vermögen. 5

Wie oben bereits angesprochen kann eine der zu Ermittlung der Polypeptidsequenzen eingesetzten bindenden Substanzen rekombinantes bovines rbPrP sein. Es hat sich überraschend herausgestellt, daß rekombinantes rbPrP in der Lage ist, spezifisch an PrP^{Sc} zu binden und an der entsprechenden Peptidbank die selben Sequenzen zu erkennen, wie der Antikörper 15B3 (siehe Fig. 2).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft daher die Verwendung von rekombinantem rbPrP-Protein entsprechend der Sequenz in Fig. 4. Es hat sich herausgestellt, daß bei Verabreichung von rekombinantem rbPrP mit der angegebenen Sequenz PrP^{Sc}-spezifische Antikörper produziert werden. Diesen Effekt kann man sich insbesondere im Rahmen der Prophylaxe oder Therapie zunutze machen, indem man einem Patienten rekombinantes rbPrP als Impfstoff aufbereitet verabreicht und eine entsprechende Immunantwort auslöst. 10

Die Ausgestaltung ist selbstverständlich nicht auf die Verwendung von bovinem rbPrP gemäß Fig. 4 beschränkt. Genauso gut können rekombinante PrP-Sequenzen mit artspezifischen Abweichungen von der in Fig. 4 gezeigten rbPrP-Sequenz verwendet werden. 15

Schließlich betrifft die Erfindung auch noch ein Verfahren zur Herstellung von PrP^{Sc}-spezifischen Antikörpern. Zur Immunisierung wird nicht menschlichen Säugetieren mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis verabreicht und der dagegen gebildete Antikörper mit üblichen Methoden isoliert. 20

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich schließlich auch zur Verwendung in sogenannten pharmazeutischen oder chemischen Libraries, mit denen neue Wirkstoffe getestet bzw. ermittelt werden, die spezifisch an PrP^{Sc} binden. 25

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prionics AG
- (B) STRASSE: Winterthurerstr. 190
- (C) ORT: Zuerich
- (D) BUNDESLAND: Zuerich
- (E) LAND: Schweiz
- (F) POSTLEITZAHL: CH-8057

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Synthetische Polypeptide zur Diagnose und
>c< Therapie von Prionerkrankungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:
ANMELDENUMMER: DE 19741607.1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 219 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bos taurus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Arg	Tyr	Pro	Gly 20	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly 25	Gly	Asn	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gln
Gly	Gly	Gly 35	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro 40	His	Gly	Gly	Gly	Trp 45	Gly	Gln	Pro
His	Gly 50	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln 55	Pro	His	Gly	Gly	Gly 60	Trp	Gly	Gln	Pro
His 65	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly 70	Gln	Pro	His	Gly	Gly 75	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln 80
Gly	Gly	Thr	His	Gly 85	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro 90	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr 95	Asn
Met	Lys	His	Val 100	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala 105	Ala	Gly	Ala	Val	Val 110	Gly	Gly
Leu	Gly	Gly 115	Tyr	Met	Leu	Gly	Ser 120	Ala	Met	Ser	Arg	Pro 125	Leu	Ile	His
Phe	Gly 130	Ser	Asp	Tyr	Glu	Asp 135	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu 140	Asn	Met	His	Arg
Tyr 145	Pro	Asn	Gln	Val	Tyr 150	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp 155	Gln	Tyr	Ser	Asn	Gln 160
Asn	Asn	Phe	Val	His 165	Asp	Cys	Val	Asn	Ile 170	Thr	Val	Lys	Glu	His 175	Thr
Val	Thr	Thr	Thr 180	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn 185	Phe	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Ile	Lys
Met	Met	Glu 195	Arg	Val	Val	Glu	Gln 200	Met	Cys	Ile	Thr	Gln 205	Tyr	Gln	Arg
Glu	Ser 210	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Gln 215	Arg	Gly	Ala	Ser					

Patentansprüche

1. Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrP^{Sc}-bindenden Substanzen erkannt werden.
2. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mindestens eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:

a) Gly-R₁-Asp-R₂-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)

b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)

c) Cys-R₇-Thr-Gln-Tyr-R₈-R₉-Glu-Ser-R₁₀-Ala-(R₁₁Tyr)

d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R₁₂-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen $R_1 = \text{Asn}$ oder Ser , $R_2 = \text{Trp}$ oder Tyr , $R_3 = \text{Arg}$ oder Lys , $R_4 = \text{Met}$, Val oder Ala , $R_5 = \text{Gln}$, Glu oder Arg , $R_6 = \text{Ser}$ oder Asn , $R_7 = \text{Val}$, Thr oder Ile , $R_8 = \text{Gln}$ oder Glu , $R_9 = \text{Lys}$, Arg oder Glu , $R_{10} = \text{Gln}$ oder Glu , $R_{11} = \text{Tyr}$, Ser oder Ala und $R_{12} = \text{His}$, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

3. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mindestens eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:

e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly

f) Lys-Pro-R₁₄-Lys-Pro-Lys-Thr-R₁₄-R₁₅-Lys-His-R₁₆-Ala-Gly

g) Tyr-R₁₆-Leu-Gly-Ser

h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R₁₇-R₁₇-His-Phe-Gly-R₁₄-Asp

i) Asn-Met-R₁₈-Arg-Tyr-(Pro-R₁₄)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R₁₉)

in denen R₁₄ = Asn oder Ser, R₁₅ = Met, Leu oder Phe, R₁₆ = Met, oder Val, R₁₇ = Ile, Leu oder Met, R₁₈ = His, Tyr oder Asn und R₁₉ = Lys oder Arg ist, und die in Klammern angegebenen Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

4. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz gegebenenfalls über eine übliche Spacersequenz mit einer "Konformations"-sequenz gekoppelt ist, die die Ausbildung einer definierten Konformation des synthetischen Polypeptids induziert.
5. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die "Konformations"-sequenz die Ausbildung eines β -Strands induziert.

6. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 2, 4 und 5 entsprechend einer der folgenden Formeln:

e) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-Z-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-(Y)

f) (X)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z. B. Gly-Gly ist, R₃ = Arg oder Lys, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn und R₁₃ = Met oder Val ist, und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

7. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in mindestens einer Teilsequenz in retro-Form vorliegt.

8. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der enthaltenen Aminosäuren in der D-Form vorliegt.

9. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in derivatisierter Form vorliegt.

10. Pharmazeutische Zubereitung zur Therapie von Prionerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eines der in den Ansprüchen 1-9 genannten synthetischen Polypeptide oder mindestens eine die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-bindende Substanz in einer zur Therapie oder Vorbeugung ausreichenden Dosis enthält.

11. Mittel zur Diagnose von Prionerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eines der in den Ansprüchen 1-9 genannten synthetischen Polypeptide oder mindestens eine die definierte Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-bindende Substanz in einer für den jeweiligen Nachweis ausreichenden Dosis enthält.

12. Impfstoff zur Vorbeugung und Therapie von Prionerkrankungen mit mindestens einem der Polypeptide gemäß den Ansprüchen 1-9 oder mindestens einer die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-spezifischen Substanz in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis.

13. Pharmazeutische Zubereitung zur Diagnose oder Impfstoff nach einem der Ansprüche 9-12, dadurch gekennzeichnet, daß die enthaltene PrP^{Sc}-bindende Substanz rekombinant erzeugtes rbPrp mit der in Fig. 4 wiedergegebenen Formel bzw. artspezifischer Abweichungen davon ist.

14. DNA-Molekül, das mindestens für eines der synthetischen Polypeptide nach den Ansprüchen 1 bis 9 kodiert.

15. Kit zur Detektion PrP^{Sc} bzw. von Antikörpern dagegen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens ein synthetisches Polypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 9 enthält.

16. Verfahren zur Herstellung von PrP^{Sc} spezifischen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-menschliche Säugetiere mit mind. einem Polypeptid gemäß der Ansprüche 1-9 immunisiert werden und der bzw. die dagegen gebildete(n) Antikörper nach einer zur Immunisierung ausreichenden Zeitperiode auf üblichem Wege aus dem Säugetier isoliert werden.

17. Verfahren zur Detektion von PrP^{Sc} spezifischen Oberflächensequenzbereichen, dadurch gekennzeichnet, daß eine PrP-spezifischer Peptidbank mit PrP^{Sc}-bindenden Substanzen inkubiert und mittels gängiger Visualisationstechniken die bindenden Bereiche der Peptidbank sichtbar gemacht und daraus die Sequenzbereiche ermittelt werden.

18. Verwendung der Polypeptide nach den Ansprüchen 1-9 in einer pharmazeutischen oder chemischen Library zur Detektion von PrP^{Sc}-spezifischen Wirkstoffen.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

peptide
to detect
As

- Leerseite -

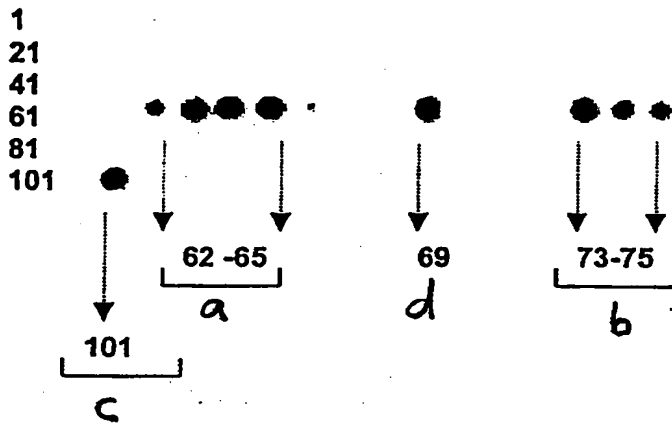


Fig 1

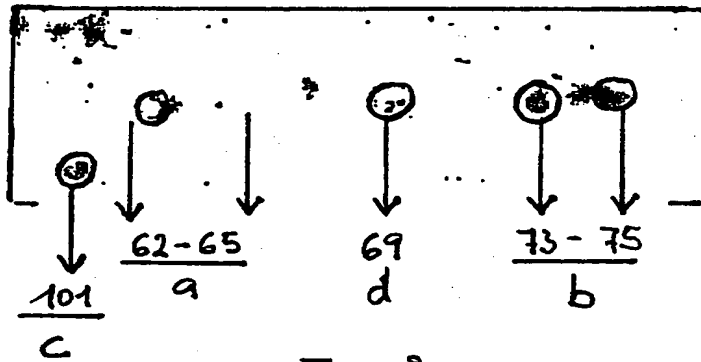


Fig 2

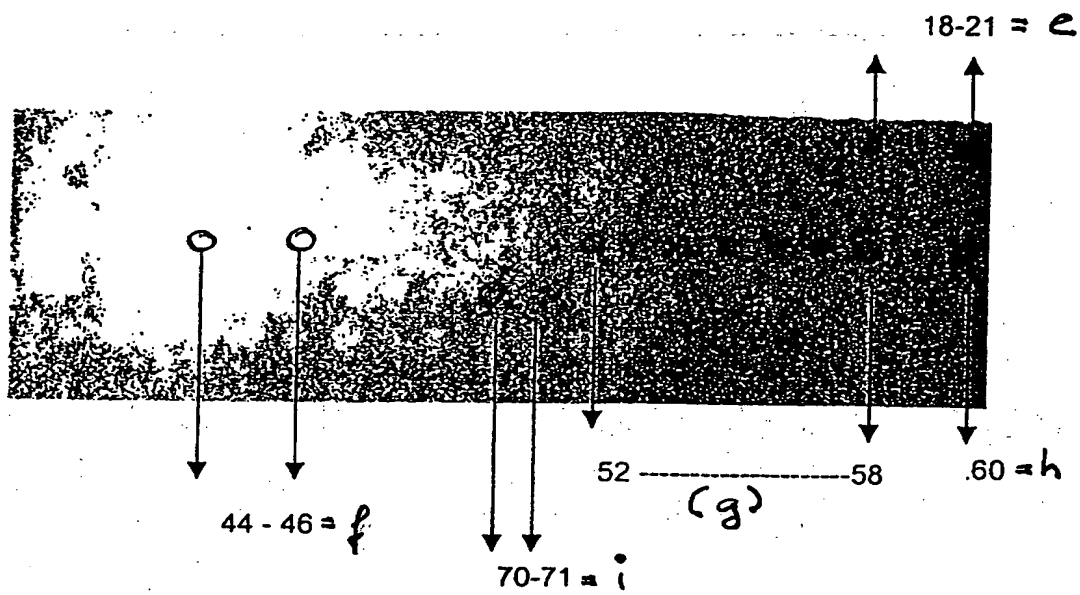


Fig 3

Met Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 35 40 45
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 50 55 60
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 65 70 75 80
 Gly Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 85 90 95
 Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly
 100 105 110
 Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His
 115 120 125
 Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg
 130 135 140
 Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Glu His Thr
 165 170 175
 Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys
 180 185 190
 Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg
 195 200 205
 Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser
 210 215

Fig 4